

ESTATUS TAXONÓMICO DE INDIVIDUOS LEPIDOPTERA EN UNA ZONA DE SUBPÁRAMO DEL PNN CHINGAZA (COLOMBIA)

Juan Diego Duque-Zapata

Universidad de La Salle, Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia.

Correo electrónico: juandiegoduquez@gmail.com

RESUMEN

La generación de planes de manejo y conservación de la biodiversidad, así como el monitoreo y medición de los cambios ambientales que la están modificando, son una prioridad en áreas o ecosistemas poco explorados. Como un primer paso en el alcance de este logro es necesario conocer y catalogar la biodiversidad usando algún método de identificación taxonómica. Este trabajo determinó el estatus taxonómico de individuos del orden Lepidoptera, en una zona poco estudiada como lo es el subpáramo en el Parque Nacional Natural Chingaza. Los individuos fueron recolectados en el área en tres diferentes rangos altitudinales cerca de la Quebrada Calostros. Un total de 25 especímenes fueron identificados taxonómicamente por métodos tradicionales (morfología de las alas) y moleculares (análisis de *Barcoding*). Además se usaron herramientas filogenéticas y el algoritmo ABGD para corroborar la taxonomía. Los individuos capturados fueron asignados a 10 géneros, siendo en un 95 % individuos pertenecientes a lepidópteros nocturnos. En este estudio se registran para Colombia por primera vez el 70 % de los géneros identificados en la base de datos BoldSystem. Los resultados por los diferentes métodos: tradicionales, moleculares, filogenéticos y ABGD, fueron altamente coherentes y congruentes, demostrando que el uso de la taxonomía integrada conduce a una acertada identificación de los individuos.

Palabras clave: *Barcoding*, Lepidoptera, Parque Nacional Natural Chingaza, subpáramo, taxonomía integrada.

ABSTRACT

The Generation of plans for the management and conservation of biodiversity, as well as the monitoring and measurement of the environmental changes that are modifying it, are a priority in areas or ecosystems that are not very well explored. A first step to achieve this goal, is to get to know and to catalogue the biodiversity by means of a taxonomic identification method. The aim of this work was to determine the taxonomic status of individuals in the order Lepidoptera in a poorly studied area as it is the subparamo in the Chingaza Natural National Park. The individuals were collected at three different altitudinal ranges near to the Calostros creek. Twenty five specimens were taxonomically identified by traditional (wing morphology) and molecular (*Barcoding* analysis) Methods. Furthermore, phylogenetic tools and the ABGD algorithm were implemented to corroborate the taxonomy. The captured individuals were assigned to 10 genera, where 95 % of the individuals belonged to nocturnal Lepidoptera. This study registers for the first time 70 % of the identified genera in the BoldSystem database for Colombia. The results from the different methods: traditional, molecular, phylogenetic and ABGD, were highly coherent and congruent, demonstrating that the use of integrative taxonomy leads to a precise identification of individuals.

Key words: *Barcoding*, Chingaza Natural National Park, Lepidoptera, subparamo, integrative taxonomy.

INTRODUCCIÓN

El aumento acelerado en la pérdida de especies, ha priorizado la necesidad de conocer y catalogar la diversidad de los diferentes ecosistemas, como una línea base en el manejo y conservación de la biodiversidad (Costello *et al.* 2013), así como en el monitoreo y medición de los cambios ambientales que están modificando la vida en el planeta (Costello *et al.* 2013, Hebert *et al.* 2003). Dadas estas necesidades, es fundamental hacer uso de las herramientas de la taxonomía, entendida como el área de la ciencia que busca clasificar la biodiversidad y establecer parámetros que permitan diferenciar a los organismos y agruparlos en diferentes categorías (Kirk *et al.* 2008).

El sistema taxonómico tradicional de Linneo se ha mantenido dado que es altamente acertado pero se han detectado dificultades a la hora de implementarlo en organismos pertenecientes a especies crípticas, en las cuales los caracteres morfológicos son muy similares o casi idénticos (Mayr 1942). En estos casos, el sistema Linneano es poco apropiado dado que puede conducir a identificaciones inadecuadas (Laurito *et al.* 2013), como ocurre frecuentemente en especies de Lepidoptera (Hebert *et al.* 2004), Hymenoptera (Bickford *et al.* 2007) y Diptera (Foster *et al.* 2013). Además a la dificultad de clasificar organismos de especies crípticas, el uso y aplicación del método del sistema de tradicional, requiere un alto nivel de experiencia y conocimiento en el grupo de estudio, lo que en algunos casos limita la identificación taxonómica por este método (Hebert *et al.* 2003).

En la actualidad, la oferta de nuevas herramientas y métodos para el análisis de otro tipo de caracteres, como los moleculares, han fortalecido y complementado la identificación y clasificación de las especies (Medellin 1988, Hebert *et al.* 2003). Uno de los métodos moleculares más usados es el *Barcoding* (Sourakov & Zakharov, 2011, Web *et al.* 2012) implementado como parte de la ejecución del proyecto mundial Barcode of Life (<http://www.barcodeoflife.org/>), el cual es una iniciativa internacional que promueve el uso de secuencias cortas del genoma, llamadas códigos de barras de ADN y que están presentes en todos los organismos, para establecer un catálogo de la biodiversidad

(Hebert *et al.* 2003). La implementación de los códigos de barras tiene el potencial para reconocer, descubrir y describir especies, buscando y asignando a una muestra desconocida, una especie o estatus taxonómico que se encuentre dentro de este catálogo o base de datos. Uno de estos códigos de barras es un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I - COI (Hebert *et al.* 2003), el cual hace parte del conjunto de marcadores moleculares incluidos en el proyecto código de barras de ADN (Hajibabaei *et al.* 2006; Ivanova *et al.* 2009). Este fragmento está presente en más del 95 % de las especies de animales descritas hasta el momento y es lo suficientemente variable para establecer diferencias entre ellas (Hajibabaei *et al.* 2006). En insectos, se ha demostrado que de 521 especies nominales analizadas, el 97,9 % de ellas reflejan una secuencia “barcode” distintiva, lo que contribuyó a su correcta identificación taxonómica (Hajibabaei *et al.* 2006) así como al estudio de especies crípticas (Hebert *et al.* 2004).

Sin embargo, así como el método tradicional para la identificación y clasificación taxonómica presenta dificultades, los métodos moleculares como *Barcoding* también las exhiben. Una de ellas está asociada a que para que este método sea altamente efectivo en la identificación taxonómica, la secuencia de algún individuo de la especie de estudio debe estar registrada en las bases de datos adscritas al proyecto *Barcode of Life* (Meyer & Paulay, 2005) o la base de datos GenBank. Otra dificultad está asociada en su eficiencia para reconocer especies en las cuales eventos recientes como hibridación, introgresión y radiación adaptativa han ocurrido (Ward *et al.* 2009). Así mismo algunos autores sugieren que el éxito de este método es alto cuando se hacen estudios en poblaciones pequeñas y poco estudiadas ya que la diversidad genética es más baja dentro las especies y no entre las especies (Elias *et al.* 2007). Para disminuir las dificultades de cada método y de esta manera lograr una buena identificación taxonómica, algunos investigadores sugieren realizar estudios de taxonomía integrada, la cual se puede entender como la unión de diferentes tipos de datos, resultados y métodos para la identificación taxonómica de especies, optimizando las ventajas de cada método utilizado, llevando así a una mayor y mejor aproximación a la

realidad taxonómica (Dayrat 2005). Además, complementar los métodos de identificación taxonómica (tradicional y molecular) con herramientas filogenéticas puede contribuir al conocimiento de la diversidad y clasificación taxonómica de los organismos (Wheeler 2004, Hajibabaei *et al.* 2006, Núñez-Aguila *et al.* 2013).

En Colombia, uno de los ecosistemas que posee pocos registros sobre su biodiversidad es el páramo (Anónimo Greenpeace 2009), siendo así un excelente ecosistema candidato para la implementación de taxonomía integrada. Este ecosistema es reconocido por ser corredor biológico de diferentes especies y por ser un importante proveedor de servicios ecosistémicos hídricos (Holzenthal & Flint, 1995). Una de las principales características que posee, es que muchas de sus especies tienen un alto grado de endemismo dadas las adaptaciones específicas que han desarrollado para sobrevivir en este hábitat (Hedberg, 1992; Dirnböck *et al.* 2011). Sin embargo, diferentes actividades antropogénicas así como cambios ambientales han provocado transformaciones en las condiciones iniciales del páramo, generando cambios en el área de distribución de algunas de las especies y en algunos casos un incremento en el riesgo de extinción de algunas de ellas (Anónimo Greenpeace 2009). Una vía para entender el grado e impacto de los cambios ambientales sobre estos ecosistemas tropicales, es el estudio de grupos de organismos altamente sensibles a estas transformaciones de los ecosistemas como son los lepidópteros (Yáñez 2008).

El orden Lepidoptera posee una alta diversidad a nivel mundial, mucha de ella desconocida en el Neotrópico y con una gran cantidad de casos propuestos como especies crípticas, dificultando su identificación y clasificación taxonómica (Hebert *et al.* 2004, Friberg *et al.* 2008), características que lo convierten en un grupo ideal para la implementación del método *Barcoding* y del sistema de taxonomía integrada (Hebert *et al.* 2004; Liu *et al.* 2014). El uso de este método en Lepidoptera, permitió asignar un Barcode específico al 98 % de individuos estudiados de la familia Geometridae en el estado de Bavaria, Alemania (Hausmann *et al.* 2011). En los Andes tropicales, esta herramienta junto con nueva información morfológica, permitió identificar una especie y dos subespecies nuevas del género

Adelpha (Willmott & Hall, 2013). El método *Barcoding* también fue implementado en colecciones de Lepidoptera del *Royal Museum for Central Africa* en donde para la familia Lymantriidae se demostró que este método es capaz de distinguir especies sin importar el deterioro físico de la muestra. En el mismo estudio se demostró que el carácter usado como diagnóstico morfológico entre *Stracena promelaena* y *Stracena flavescens*, es poco confiable ya que especímenes de estas dos especies presentaron la misma secuencia *Barcode* (Nagy *et al.* 2010). Aunque Colombia es reconocido como el segundo país con mayor número de lepidópteros a nivel mundial (Rangel 2005), en algunos hábitats como el páramo se desconoce mucho de las especies que los habitan (Andrade & Álvarez, 2000). Esta investigación buscó no solo demostrar y evaluar la utilidad de la taxonomía integrada para la determinación del estatus taxonómico de individuos del orden Lepidoptera, sino también contribuir al conocimiento de la biodiversidad en una zona de subpáramo del Parque Nacional Natural Chingaza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La colecta de individuos del Orden Lepidoptera se llevó a cabo en el Parque Nacional Natural Chingaza (PNN Chingaza) en el sector de la quebrada Calostros (4°39' N, 73°52' W). El PNN Chingaza está ubicado en la Cordillera Oriental de los Andes colombianos, al nororiente de Bogotá, con alturas comprendidas entre 400 y 4020 m.s.n.m. la captura se realizó durante 8 días de los meses de julio de 2014 y de junio de 2015. Se designaron tres zonas de muestreo en el área de subpáramo que comprenden diferentes rangos altitudinales: zona 1 (3000 - 3200 m s. n. m.), zona 2 (3200 - 3400 m s. n. m.) y zona 3 (3400 - 3700 m s. n. m.).

Recolecta y preservación

La captura y recolecta de los individuos se realizó diariamente con trampas Van Someren-Rydon con fruta en estado de descomposición como cebo. En cada una de las zonas de muestreo se ubicaron, de forma aleatoria, seis trampas adaptadas con luz LED, para cubrir cada uno de los rangos altitudinales. El tórax de los individuos colectados se preservó en alcohol

absoluto para su posterior análisis molecular, mientras que las alas fueron guardadas en sobres de papel milano para su posterior identificación, clasificación e ingreso a la colección de Lepidoptera del Museo La Salle.

Caracterización morfológica del estatus taxonómico

La identificación tradicional de los ejemplares se basó únicamente en la morfología de las alas. La identificación tradicional se realizó con base en la consulta de las guías de identificación taxonómica (Carter 1993, Triplehorn & Johnson 2005, Delvare *et al.* 2002). Las alas de los especímenes fueron fotografiadas en el Museo La Salle con una cámara Nikon D7000.

Caracterización molecular del estatus taxonómico

El ADN genómico fue aislado usando el kit comercial DNesasy (QIAGEN, Inc.). Posteriormente, se amplificó el segmento *Barcode* del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) con la técnica de PCR con los cebadores LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAA RAAYCA-3') (Altschul *et al.* 1997, Meyer & Paulay, 2005). La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 30 μ L que incluían 12,8 μ L de agua, 6 μ L de buffer 6X, 3 μ L de dNTPs 10 μ M, 3 μ L de cloruro de magnesio (MgCl₂) 25 μ M, 1,5 μ L de cada uno de los cebadores 10 μ M, 0,2 μ L de Taq polimerasa y 2 μ L de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por dos minutos, 34 ciclos de anillamiento a 94°C por 40 segundos, 48°C por 30s, 72°C por un minuto y, finalmente, un período de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron enviados para limpieza y secuenciación con el método Sanger a los laboratorios de Macrogen, Corea (<http://www.macrogen.com/>).

Las secuencias se limpiaron (eliminación de las secuencia de los *primers*) y editaron con el software GENEIOUS versión 9.1.4 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.* 2012) y se alinearon inicialmente con el software MUSCLE (<http://www.drive5.com/muscle/>;

Edgar, 2004) con una revisión posterior que buscó verificar el alineamiento realizando la traducción a proteína de las secuencias alineadas. Posteriormente, cada secuencia fue comparada con las secuencias disponibles en dos bases de datos. La primera base fue la asociada al proyecto *Barcode* denominada "BoldSystem" (<http://www.BoldSystems.org/>), en esta plataforma se escogió la opción comparar con *All Barcodes Record Database* la cual hace la comparación con todas las secuencias COI disponibles en la base de datos. Por otro lado, las secuencias fueron comparadas también con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (Genbank-NCBI), empleando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool -BLAST (Altschul *et al.* 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), se escogió la opción de comparar con *Nucleotide collection* y se realizó un MegaBlast, posteriormente se empleó como criterio de escogencia el porcentaje más alto de identidad (> 95 %) (columna *Ident*).

Para cada descripción taxonómica obtenida, se realizó la búsqueda fotográfica en la base de datos *BoldSystem* con la que se realizó una comparación y corroboración fotográfica de los individuos. Las secuencias fueron cargadas y depositadas en un proyecto de la base de datos de *Barcode* (<http://www.BoldSystems.org/>) bajo el nombre de: *Butterflies of Colombia* con las siglas MDC, los ejemplares en esta base de datos son encontrados con los números de identificación (ID): MDC001-16 a MDC020-16. Además, se implementó el algoritmo ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation*) (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>), el cual asigna dentro de grupos hipotéticos (potenciales especies) a las muestras de un alineamiento, estimando un "*Barcode gap*" en la distribución de diferencias por pares o *pairwise differences*. Los siguientes parámetros fueron tomados en cuenta: valor máximo de divergencia intraespecífica entre 0,001 y 0,1 con 10 pasos recursivos dentro de la partición primaria y un ancho de gap de 1,0 (Guarnizo *et al.* 2015). Como modelo de sustitución nucleotídica se usó Kimura (K2P), este parámetro junto con los anteriores fueron escogidos a partir de revisiones en estudios previos, en donde se propone que su implementación permite una agrupa-

ción acertada y congruente con la clasificación taxonómica (Guarnizo *et al.* 2015).

Análisis filogenético

Un individuo de *Leptinotarsa decemlineata* fue empleado como *outgroup* o grupo ajeno (código Genbank: KM450707), el *outgroup* fue escogido utilizando los datos obtenidos en la identificación taxonómica, y pertenece a un orden diferente a Lepidoptera, pero a la misma clase taxonómica. El análisis consistió en una reconstrucción filogenética, empleando las secuencias objeto de estudio, bajo los criterios de máxima verosimilitud (ML) y máxima parsimonia (MP). Para la reconstrucción del árbol ML se utilizó el modelo evolutivo *General Time Reversible* (GTR + G), este modelo presentó el mejor valor bajo el criterio de información bayesiana (BIC) en la prueba de selección del modelo evolutivo, implementada en el programa jModelTest 2.1 (Darriba *et al.* 2011). Los siguientes parámetros fueron tomados en cuenta para la reconstrucción del árbol con el algoritmo ML: una distribución gamma así como una eliminación completa de los *gaps*. Como método heurístico se implementó el *Nearest Neighbor Interchange* (NNI) junto con un *Neighbour Joining* como árbol inicial, finalmente no se utilizó ningún filtro para el intercambio de ramas. Los parámetros usados en el árbol MP fueron: una eliminación completa de los *gaps* así como el método de búsqueda *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR), 10 árboles iniciales con un valor de uno como nivel de búsqueda, el número máximo de árboles para retener fue de 100. Para cada reconstrucción del árbol se realizaron 1000 replicaciones en *bootstrap* para asegurar una mayor fiabilidad en los nodos creados. Las reconstrucciones se hicieron con ayuda del programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.* 2016).

RESULTADOS

Un total de 25 individuos fueron recolectados y analizados, capturándose 15 individuos en la zona uno (más baja elevación), nueve en la zona dos (elevación intermedia) y uno en la zona tres (más alta elevación). Los ejemplares fueron debidamente montados, etiquetados e ingresados a la colección de Lepidoptera del Museo La Salle bajo los números de identificación ID: MLS 50676 a MLS 50689 (Tabla 1). De los 25 individuos colectados, 14 fueron

aceptados para ser ingresados a la colección del Museo La Salle, los demás no ingresaron dado el mal estado en el que se encontraban.

Identificación taxonómica tradicional y molecular

El método tradicional permitió identificar cuatro de los especímenes hasta el nivel de familia, tres hasta nivel de género y los otros fueron catalogados hasta orden (Tabla 1), haciendo evidente la dificultad para identificar especímenes con el uso de claves taxonómicas. Por otro lado, en 20 de los 25 individuos colectados fue posible implementar el método de caracterización molecular, amplificando el segmento de gen COI con un tamaño de 658 pb.

Al contrastar las secuencias de los individuos colectados con las almacenadas en las bases de datos *BoldSystem* y NCBI, en ninguna de ellas se obtuvo 100 % de similitud o identidad (Tabla 2). Esta observación evidencia que la información molecular para estos grupos taxonómicos no ha sido cargada previamente a estas diferentes plataformas.

En la base de datos de NCBI, algunos individuos obtuvieron dos resultados diferentes es decir dos especies y frecuentemente géneros diferentes con idéntico porcentaje de similitud, así mismo se observa que algunos individuos también tuvieron resultados diferentes en ambas bases de datos como lo fueron los individuos ID: JDN1, JDN12, JDN14, JDN4, JDN6 y JDN17 (Tabla 2). En este estudio, el criterio para determinar cuál de los resultados para cada espécimen era el más acertado fue la comparación fotográfica entre los individuos capturados y las fotografías de la base de datos de *BoldSystem* (Tabla 1).

Las comparaciones realizadas con la base de datos de *BoldSystem*, permitieron identificar 16 de las secuencias hasta el nivel de Género y 4 secuencias hasta el nivel de Especie. Por otra parte, en la base de NCBI se lograron identificar 9 de las secuencias hasta el nivel de Género y 11 secuencias hasta el nivel de especie (Tabla 2), haciendo en este punto más eficiente la identificación taxonómica por comparación a la base de NCBI.

Tabla 1. Identificación taxonómica con los métodos tradicional y molecular. Se muestra los números de identificación (ID) para cada individuo en la base del colector, la colección Lepidoptera del Museo La Salle y en la base de datos de BoldSystem. El estatus taxonómico descrito en el método molecular fue el establecido bajo el criterio de porcentajes de similitud o identidad mayores a 95 %. La sigla NA hace referencia a no asignado

Número de identificación (ID)			Método de clasificación	
Colector	Museo La Salle	BoldSystem	Tradicional	Molecular
JDN 1	MLS 50681	MDC003-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 2	MLS 50680	MDC004-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Eupithecia</i>
JDN 3	MLS 50687	MDC005-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Megalopyge</i>
JDN 4	NA	MDC006-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 5	MLS 50689	MDC007-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 6	MLS 50685	MDC008-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Dargida</i>
JDN 7	MLS 50684	MDC009-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Isochromodes</i>
JDN 8	MLS 50683	MDC010-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Lomographa</i>
JDN 9	NA	MDC011-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Lomographa</i>
JDN 10	NA	MDC012-16	Familia: Erebiidae	Género: <i>Lophocampa</i>
JDN 11	MLS 50679	MDC013-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Eupithecia</i>
JDN 12	NA	MDC014-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 13	NA	NA	Género: <i>Agylla</i>	NA
JDN 14	NA	MDC015-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Agylla</i>
JDN 15	MLS 50676	MDC001-16	Familia: Saturniidae	Género: <i>Meroleuca</i>
JDN 16	MLS 50686	MDC016-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Megalopyge</i>
JDN 17	MLS 50682	MDC017-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Aragua</i>
JDN 18	MLS 50688	MDC018-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Isochromodes</i>
JDN 19	NA	MDC019-16	Orden: Lepidoptera	Género: <i>Podanotum</i>
JDN 20	MLS 50677	MDC002-16	Familia: Saturniidae	Género: <i>Meroleuca</i>
JDN 21	MLS 50675	MDC020-16	Familia: Saturniidae	Género: <i>Meroleuca</i>
JDN 22	NA	NA	Género: <i>Agylla</i>	NA
JDN 23	NA	NA	Orden: Lepidoptera	NA
JDN 24	NA	NA	Género: <i>Agylla</i>	NA
JDN 25	NA	NA	Orden: Lepidoptera	NA

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por ambos métodos: tradicional y molecular, podemos concluir que los organismos de Lepidoptera colectados en este estudio tuvieron la siguiente distribución: en la zona uno, más cercana al bosque montano, se encontraron individuos pertenecientes tentativamente a los géneros *Agylla*, *Aragua*, *Dargida*, *Isochromodes*, *Lomographa*, *Meroleuca* y *Podanotum*; en la

zona dos (altitud intermedia) individuos pertenecientes tentativamente a los géneros *Agylla*, *Eupithecia*, *Isochromodes*, *Lophocampa*, *Megalopyge* y *Meroleuca*. Finalmente, el individuo capturado en la zona tres (mayor altitud), es perteneciente tentativamente al género *Agylla*, siendo este último género el que se encontró en las tres zonas de muestreo.

Tabla 2. My caption

ID	Base de datos		Base de datos		Similitud (%)	Base de datos		Similitud (%)	Grupo ABGD
	BoldSystem	Especie	NCBI	Especie					
	Género		Género						
JDN1	<i>Agylla</i>	NA	<i>Agylla</i>	NA	93,18	<i>Apistosis</i>	NA	91	A
JDN12	<i>Agylla</i>	NA			93,88	<i>Apistosis</i>	<i>A. judas</i>	91	
JDN14	<i>Agylla</i>	NA			94,19	<i>Apistosis</i>	<i>A. judas</i>	92	A
JDN4	<i>Agylla</i>	NA			94,19	<i>Apistosis</i>	<i>A. judas</i>	92	A
JDN5	<i>Agylla</i>	NA			97,25	<i>Agylla</i>	NA	94	D
JDN2	<i>Eupithecia</i>	NA			93,27	<i>Eupithecia</i>	NA	93	B
JDN11	<i>Eupithecia</i>	NA			93,43	<i>Eupithecia</i>	NA	93	B
JDN3	<i>Megalopyge</i>	NA			90,67	<i>Megalopyge</i>	NA	90	C
JDN16	<i>Megalopyge</i>	NA			91	<i>Megalopyge</i>	NA	93	C
JDN6	<i>Dargida</i>	<i>D. pyrosoma</i>			96,18	<i>Anarta</i>	<i>A. myrtili</i>	96	E
JDN7	<i>Isochromodes</i>	NA			96,64	<i>Isochromodes</i>	NA	96	F
JDN18	<i>Isochromodes</i>	NA			96,48	<i>Isochromodes</i>	NA	96	F
JDN8	<i>Lomographa</i>	NA			96,33	<i>Lomographa</i>	NA	96	G
JDN9	<i>Lomographa</i>	NA			97,25	<i>Lomographa</i>	NA	97	G
JDN10	<i>Lophocampa</i>	<i>L. hyalinipuncta</i>			98,17	<i>Lophocampa</i>	<i>L. griseidorsata</i>	95	H
JDN15	<i>Meroleuca</i>	NA			99,54	<i>Meroleuca</i>	<i>M. carpishiana</i>	90	I
						<i>Gamelia</i>	<i>G. remisoides</i>	90	
JDN20	<i>Meroleuca</i>	NA			99,39	<i>Meroleuca</i>	<i>M. carpishiana</i>	90	I
JDN21	<i>Meroleuca</i>	NA			99,39	<i>Meroleuca</i>	<i>M. carpishiana</i>	90	I
						<i>Meroleuca</i>	<i>M. nievastiana</i>	90	
JDN17	<i>Aragua</i>	<i>A. bistonaria</i>			96,31	<i>Aragua</i>	<i>A. bistonaria</i>	96	J
JDN19	<i>Podanotum</i>	<i>P. vaneurighi</i>			99,85	<i>Symbiopsis</i>	<i>S. tanais</i>	95	K
						<i>Callonhrus</i>	<i>C. polios</i>	95	

Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos de consenso obtenidos por ambos criterios, ML (Figura 1) y MP (Anexo 1) para los 20 lepidópteros secuenciados, mostraron una gran similitud en las relaciones entre los especímenes, siendo idénticos en el caso de los géneros: *Agylla*, *Eupithecia*, *Isochromodes*, *Lomographa*, *Lophocampa*, *Megalopyge* y *Meroleuca*. Así mismo en casos como *Meroleuca* se observa que algunos especímenes no poseen secuencias idénticas, sugiriendo que, aunque los individuos son del mismo género, podrían ser de especies diferentes. Los valores

del consenso *bootstrap* mostrados en los árboles de ML y MP, pueden ser considerados como confiables ya que la mayoría de los soportes sobrepasan el 50 % (Holmes 2003). Los árboles obtenidos por ML y MP fueron congruentes con los resultados obtenidos a partir de las identificaciones taxonómicas tradicionales y moleculares, ya que los grupos formados en cada árbol reflejan los asignados con la identificación taxonómica, como es el caso de *Agylla*, en la cual cinco individuos fueron asignados a este género, y estos mismos individuos aparecen altamente relacionados en los árboles (Figura 1, Anexo 1).

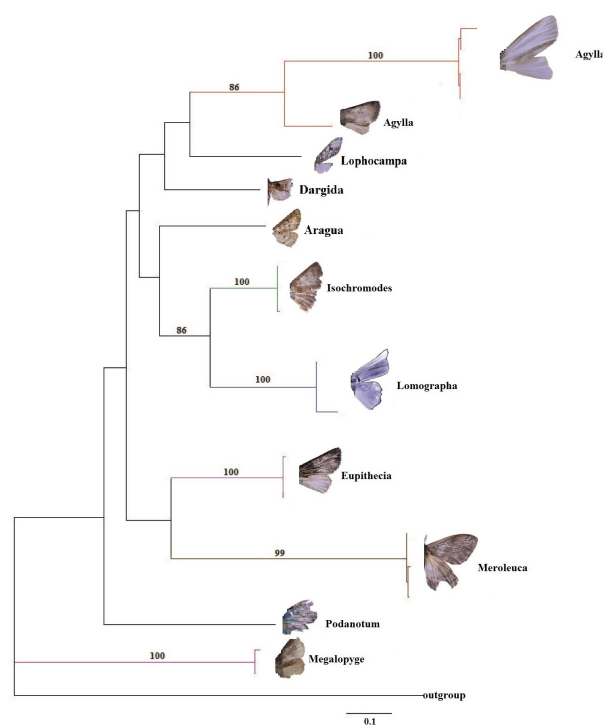


Figura 1. Filogenia consenso bajo el criterio de Máxima Verosimilitud para el fragmento *Barcode* COI. Los números sobre las ramas son los soportes de *bootstrap* mayores a 50 %. Los nombres corresponden a los géneros identificados a través del método molecular *Barcoding*.

Delimitación de especies bajo el algoritmo ABGD

Los resultados del análisis con ABGD establecieron que las secuencias de los individuos colectados podían ser agrupadas dentro de 11 *clusters*, es decir 11 diferentes “grupos” hipotéticos (Figura 2 y Tabla 2). Los *clusters* determinados por ABGD muestran una alta congruencia con la identificación taxonómica, en

la cual los 10 géneros establecidos por esta última corresponden a 10 de los *clusters* de ABGD (Tablas 1 y 2). El *cluster* extra en ABGD, grupo D, fue clasificado dentro del género *Agylla* en la identificación taxonómica y en los árboles filogenéticos es el menos relacionado con los individuos del mismo género, sugiriendo que para el género *Agylla* hay individuos de más de una especie.

DISCUSIÓN

Algunos de los géneros tentativamente identificados dentro de los individuos analizados no habían sido reportados en el rango altitudinal descrito en este estudio, este es el caso de *Agylla*, la cual había sido reportada en gradientes altitudinales entre los 1400 y 2000 m s. n. m. (Muñoz & Amarillo 2010) y en este estudio, *Agylla* fue el género encontrado en las tres zonas de muestreo entre 3000-3600 m s. n. m.; el género *Dargida* ha sido reportado a unos 2560 m s. n. m. (Rodríguez & Angulo 2005), en este estudio se encontró entre los 3000-3200 m s. n. m.; los géneros *Isochromodes* y *Lomographa* registrados entre los 1950-2005 m s. n. m. (Brehm & Fiedler 2005), acá fueron encontrados entre los 3000 - 3200 m s. n. m. Estas observaciones preliminares sugieren que

el rango de distribución de estos géneros se ha movido o extendido a mayores elevaciones o que las identificaciones pueden estar erradas.

Estudios previos sobre la diversidad de lepidópteros en el páramo, afirman que la familia más abundante es la Nymphalidae (Montero & Ortiz 2013, Andrade & Álvarez 2000), no obstante, los resultados de este estudio no asignaron ningún individuo a esta familia. Esto pudo deberse al método de colecta, dado que los estudios previos se enfocaron en la diversidad de lepidópteros diurnos, usando como método de muestreo principal jamas entomológicas, mientras que en esta investigación la mayoría de individuos fueron lepidópteros nocturnos (95 % del total de individuos analizados) capturados con trampas de luz.

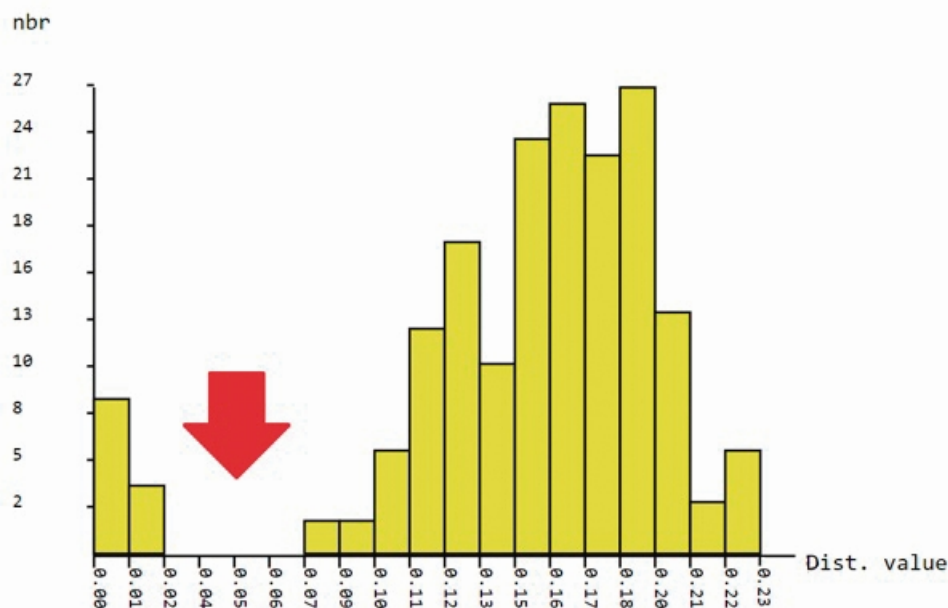


Figura 2. Histograma de la distribución de la distancia genética entre pares de secuencias COI. Frecuencia de los valores de distancia por pares de secuencias COI. La flecha indica el *gap* o umbral seleccionado como separación de la variación genética dentro de las especies y la divergencia entre las especies. El eje X hace referencia al valor de la distancia genética y el eje Y hace referencia a la frecuencia.

Al implementar los métodos de identificación taxonómica, el 16 % de los individuos capturados pudieron ser identificados por medio del método tradicional hasta familia (Tabla 1). La falta de precisión en la implementación de este método, pudo deberse a que en el momento

de la identificación tradicional la mayoría de individuos solo contaban con sus pares de alas, impidiendo que caracteres de identificación morfológicos como antenas o tórax pudieran ser tomados en cuenta. Asimismo, la coloración de las alas se va perdiendo gradualmente en

el estado adulto de los lepidópteros (Nagy *et al.* 2010), lo que genera que el uso de claves pictóricas no siempre sea de gran ayuda.

Por otra parte, todas las secuencias analizadas en las bases de datos *BoldSystem* y NCBI lograron ser identificadas taxonómicamente hasta un nivel tentativamente de género, lo que demuestra que el uso de herramientas y metodologías con datos moleculares como el *Barcode* fueron más rápidas y eficientes para la identificación taxonómica de los individuos en este estudio. Sin embargo, ninguna secuencia obtuvo un 100 % de similitud o identidad con las registradas en las dos bases de datos, incluso ocho de estas, pertenecientes a los géneros *Agylla*, *Eupithecia* y *Megalopyge*, obtuvieron un bajo porcentaje de similitud (<95 %) (Romero & Ramirez 2011) lo que pone en duda incluso la asignación a género de estos especímenes. La falta de identidad o similitud en un 100 % deja en manifiesto no solo que aún las bases de datos se encuentran incompletas y que sus resultados están sujetos a la información que previamente ha sido cargada en ellas (Meyer & Paulay 2005), sino que también es necesario aumentar el esfuerzo por el estudio de estos géneros en el páramo colombiano y en la diversidad de lepidópteros en general del país. Adicionalmente, en la base *BoldSystem* algunos de los géneros tentativamente asignados son por primera vez reportados para Colombia: *Agylla*, *Eupithecia*, *Megalopyge*, *Isochromodes*, *Lomographa*, *Lophocampa* y *Dargida*.

Por otro lado, la mayor eficiencia de la base de NCBI pudo deberse a que aunque ambas bases trabajan bajo el mismo algoritmo BLAST, la base de NCBI tiene un campo de búsqueda más amplio, ya que no solo utiliza los datos cargados a Genbank si no que además usa los datos disponibles en otras bases como lo es *BoldSystem*.

La implementación de ABGD fue un complemento en la corroboración de los resultados del análisis de resultados filogenéticos así como de identificaciones taxonómicas. Esta misma observación se estableció en los resultados de ABGD en la identificación de anuros en la Cordillera Oriental (Guarnizo *et al.* 2015), validando la eficiencia de esta herramienta.

Como síntesis, para este estudio se observó que los resultados obtenidos por el método tradicional no brindan una información amplia y suficiente para una buena identificación, en comparación con los resultados de identificación molecular. Sin embargo, todos los resultados obtenidos tanto por métodos tradicionales, moleculares y filogenéticos, muestran entre ellos mayor coherencia y congruencia, es decir evidencian que el uso de la taxonomía integrada fue de gran ayuda para una acertada identificación. Debido a esto, se sugiere que para estudios de identificación taxonómica en ecosistemas poco estudiados como lo es el páramo del cual no existen guías de identificación taxonómicas específicas, no solo se tenga en cuenta la morfología de las especies, si no que estos estudios sean acompañados por pruebas moleculares y filogenéticas con uno o varios *out-group* de linajes más cercanos para la disminuir las posibles alteraciones en la longitud de las ramas. Del mismo modo se sugiere conservar caracteres diagnósticos como genitalia para una identificación más fiable.

Finalmente, el objetivo planteado para esta investigación fue alcanzado satisfactoriamente, logrando a partir de una combinación de métodos una identificación taxonómica de individuos del orden Lepidoptera al nivel tentativo de género en una zona de subpáramo, aportando al conocimiento de este grupo en el país, que potencialmente puede ser usado en el planteamiento de estrategias de conservación para ecosistemas tan importantes como lo es el Páramo.

AGRADECIMIENTOS

A Astrid Muñoz Ortiz y Adriana Vitolo López por su compromiso y dedicación para llevar a cabo esta investigación, a Luis Ernesto Beltrán Forero, Lina María Tarazona, al Parque Nacional Natural Chingaza, a los funcionarios y guardabosques del Parque que me brindaron su ayuda y compañía en el desarrollo de la investigación en la fase de campo, a los laboratorios de la Universidad De La Salle, donde se realizaron los análisis de las muestras y al programa de biología de la Universidad De La Salle por su apoyo financiero en la secuenciación de las muestras.

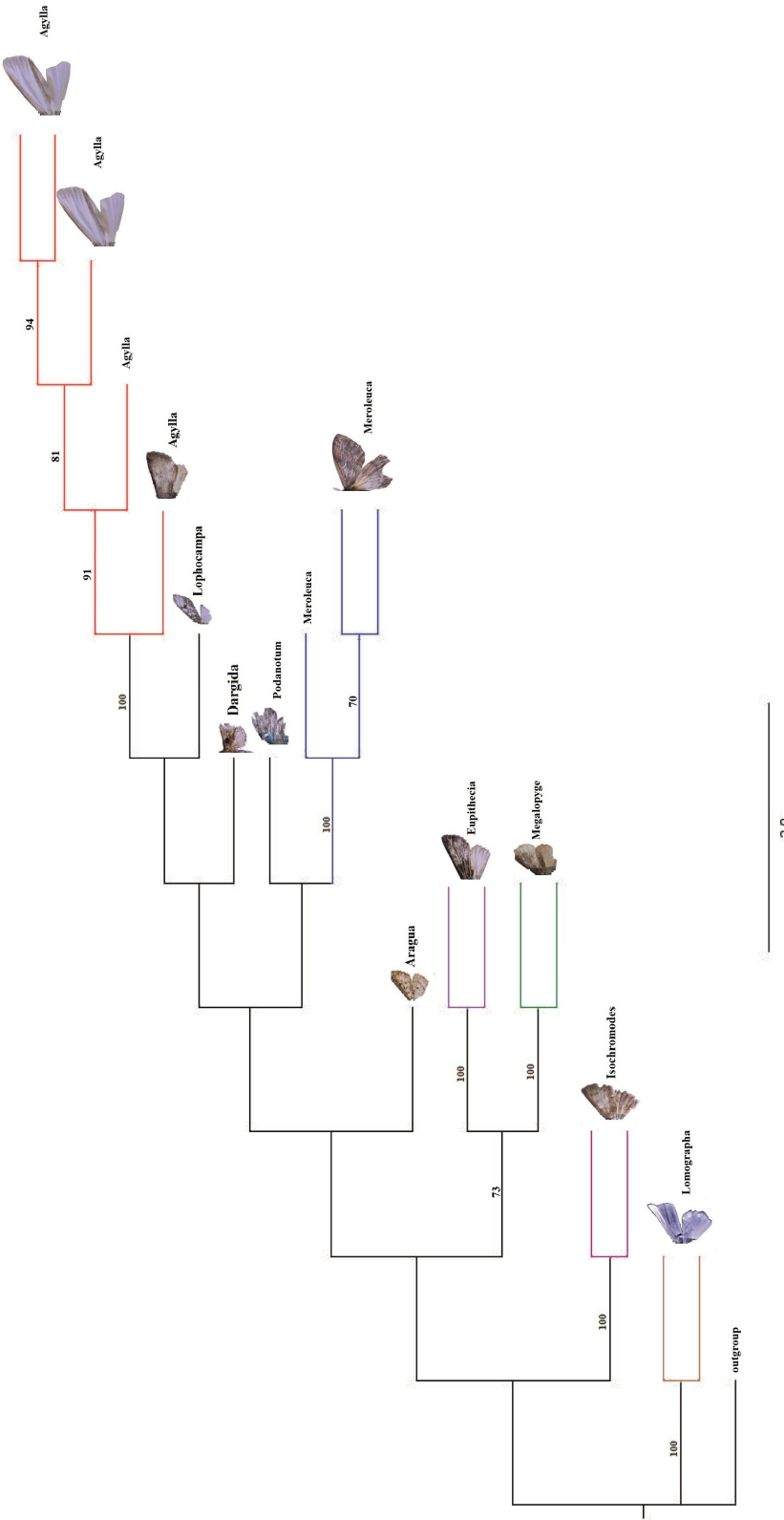
LITERATURA CITADA

- Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myers & D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- Altschul, S., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-402.
- Andrade, G & J. Álvarez. 2000. Las mariposas de las áreas de Paramo en Colombia, en: Colombia Diversidad Biótica III ed. Bogotá. Editorial Unibiblos, Andrade-C. Guía Campo de insectos de Santafé de Bogotá y alrededores. p.177.
- Anónimo, Greenpeace. 2009. El cambio climático: futuro negro para los páramos. http://www.greenpeace.org/colombia/Global/colombia/informes/informe_todo3.pdf
- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, R. Meier, K. Winker, K. Ingram & I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 148-155.
- Brehm, G & K. Fiedler. 2005. Diversity and community structure of geometrid moths of disturbed habitat in a montane area in the Ecuadorian Andes. *Journal of Research on the Lepidoptera*, 38: 1-14.
- Carter, D. 1993. Manuales de identificación: Mariposas diurnas y nocturnas. Editorial OMEGA.
- Collins, R. A & R. H. Cruickshank. 2013. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13: 969-975.
- Costello, M. J., R. M. May & N. E. Stork. 2013. Can We Name Earth's Species?. *Science*, 339: 413-416.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415.
- Delvare, G., H. Aberlenc, B. Michel & A. Figueroa. 2002 Los insectos de África y de América Tropical, Clave para la identificación de las Principales Familias. Francia. Recherche Agronomique Pour Le Développement (CIRAD).
- Dirnböck, T., F. Essl & W. Rabitsch. 2011 Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. *Global Change Biology*, 17: 990-996.
- Elias, M., R. I. Hill, K. R. Willmott, K. K. Dasmahapatra, A. V. Brower, J. Mallet & C. D. Jiggins. 2007. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274: 2881-2889.
- Foster, P. G., E. S. Bergo, B. P. Bourke, T. P. Oliveira, S. S. Nagaki, D. C. Sant' Ana & M. Sallum. 2013. Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *PLoS ONE*, 8: 54063.
- Friberg, M., N. Vongvanich, A. Borg-Karlson, D. J. Kemp, S. Merilaita & C. Wiklund. 2008. Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 873-886.
- Guarnizo, C. E., A. Paz, A. Muñoz-Ortiz, S. V. Flechas J. Méndez-Narváez & A. J. Crawford. 2015. DNA Barcoding Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. *PLoS ONE*, 10: e0127312.
- Guerra, J., F. Espinosa & J. García. 2008. Trends in Taxonomy today: an overview about the main topics. *Zoologica Baetica*, 19: 15-49.
- Hajibabaei, M., D. H. Janzen, J. M. Burns, W. Hallwachs & P. D. Hebert. 2006. DNA Barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 968-971.

- Hausmann, A., G. Haszprunar & P. D. Hebert. 2011. DNA Barcoding the geometrid fauna of bavaria (lepidoptera): Successes, surprises, and questions. *PLoS ONE*, 6: 1-9.
- Hebert, P. D., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen & W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA Barcoding reveals cryptic species in neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 14812-14817.
- Hebert, P. D., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003 Biological identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hedberg, O. 1992 Afroalpine vegetation compared to paramo: convergent adaptations and divergent differentiation. Paramo: an Andean ecosystem under human influence (H. Balslev & J. L. Luteyn eds). Academic Press, London.
- Holmes, S. 2003. Bootstrapping Phylogenetic Trees?. *Statistical Science*, 18: 241-255.
- Holzenthal, R. W & J. R. Flint. 1995. Studies of Neotropical Caddisflies, LI: Systematics of the Neotropical Caddisfly Genus *Contulma* (Trichoptera: Anomalopsychidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 575: 1-59.
- Ivanova, N. V., A. V. Borisenko & P.D. Hebert. 2009. Express barcodes: racing from specimen to identification. *Molecular Ecology Resources*, 9: 35-41.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies & A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647-164.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, D. W. Minter & J. A. Stalpers. 2008. "Taxonomy". Dictionary of the Fungi, 10th edition. CABI, Netherlands.
- Kumar, S., G. Stecher & K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Laurito, M., T. Oliveira, W. R. Almirón & M. A. Sallum. 2013. COI Barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 110-122.
- Linnaeus, C. 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata.
- Liu, X. F., C. H. Yang, H. L. Han, R. D. Ward & AB. Zhang. 2014. Identifying species of moths (Lepidoptera) from Baihua Mountain, Beijing, China, using DNA Barcodes. *Ecology and Evolution*, 4: 2472-2487.
- Mayr, E. 1942 Systematics and the Origin of Species. Columbia University. Press, New York.
- Meyer, C. P & G. Paulay. 2005. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology*, 3: e422.
- Montero, A. F & P. M. Ortiz. 2013. Aporte al conocimiento para la conservación de las mariposas (Hesperioidea y Papilionoidea) en el páramo del Tablazo, Cundinamarca (Colombia). *Boletín Científico Del Museo de Historia Natural de La Universidad de Caldas*, 17: 197-226.
- Muñoz, A & A. Amarillo. 2010. Variación altitudinal en diversidad de Arctiidae y Saturniidae (Lepidoptera) en un bosque de niebla Colombiano. *Revista Colombiana de Entomología*, 36: 292-299.
- Nagy, Z., F. Breman & U. Dall'Asta. 2010. DNA Barcoding of museum specimens of Lymantriidae preserved in the Royal Museum for Central Africa. *Entomologica Romanica*, 15: 11-16.
- Núñez-Aguila, R., P.F. Matos-Maraví & N. Wahlberg. 2013. New *Calisto* species from Cuba, with insights on the relationships of Cuban and Bahamian taxa (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae). *ZooKeys*, 165: 57-105.

- Rangel-CH. 2005. "Biodiversity of the Colombian Paramo Region and Relationships with the Antropogenic Influence", Special issue of Global Mountain Biodiversity Assessment, Suiza.
- Rodríguez, M. A & A. O. Angulo. 2005. Catalogo Crítico y Nominal del género *Dargida* Walker 1856 (Lepidoptera, Noctuidae, Hadeninae). *Gayana*, 69: 10-21.
- Romero, P & R. Ramirez. 2011. Divergencia intraespecífica y código de barras de ADN en *Systrophia helicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae). *Revista Peruana de Biología*, 18: 201-208.
- Sourakov, A & E. V.V Zakharov. 2011. "Darwin's butterflies" DNA Barcoding and the radiation of the endemic Caribbean butterfly genus *Calisto* (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae). *Comparative Cytogenetics*, 5: 191-210.
- Srivathsan, A & R. Meier. 2012. On the inappropriate use of Kimura-2- parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28: 190-194.
- Tavares, E. S & A. J. Baker. 2008. Single mitochondrial gene Barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 81.
- Triplehorn, C & N. Johnson. 2005. Borror and Delong's Introduction to the Study of Insects, Brooks Col. 7th Edition.
- Ward, R., R. Hanner & P. D. Hebert. 2009. The campaign to DNA Barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74: 329-356.
- Wheeler, Q. D. 2004. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359: 571-583.
- Willmott, K. R & J. P. Hall. 2013. A New Species and two new subspecies of *Adelpha* Hübner, 1819 from the tropical Andes (Nymphalidae: limenitidinae). *Journal of the Lepidopterists Society*, 67: 241-252.
- Yáñez, N. 2008. Mecanismo De Información De Páramos (MIP). Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina, Proyecto Páramo Andino.

Recibido abril 23 de 2017, publicado enero de 2018.



Anexo 1. Los números sobre las ramas son los valores de soporte de bootstrap mayores a 50. Los nombres corresponden a los géneros identificados a través del método molecular *Barcoding*.